

## SITOTOKSISITAS EKSTRAK DAUN MANGROVE DARUJU (*Acanthus ilicifolius*) SEBAGAI BAHAN IRIGASI SALURAN AKAR

### *(The Cytotoxicity of Daruju Mangrove (Acanthus ilicifolius) Leaf Extract as Root Canal Irrigation)*

Ratna Putri\*, Twi Agnita Cevanti\*\*, Henu Sumekar\*\*

\* Mahasiswa Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hang Tuah Surabaya

\*\* Departemen Konservasi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hang Tuah Surabaya

**Latar belakang:** Pembersihan dan pembentukan saluran akar merupakan tahapan penting pada perawatan saluran akar. Bahan irigasi diperlukan pada tahapan tersebut untuk membersihkan jaringan nekrotik, partikel dentin dan mikroorganisme. Syarat bahan irigasi saluran akar antara lain mampu melarutkan debris atau sisa jaringan, memiliki tegangan permukaan rendah, dan tidak bersifat toksik. Mangrove daruju (*Acanthus ilicifolius*) memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai alternatif bahan irigasi saluran akar karena hasil fitokimia ekstrak daunnya menunjukkan kandungan saponin, alkaloid, terpenoid dan tannin yang berpotensi sebagai antimikroba. **Tujuan:** Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui sitotoksitas ekstrak daun *Acanthus ilicifolius* terhadap kultur sel fibroblas BHK-21 **Metode:** Sampel yang digunakan adalah sel fibroblas BHK-21 dengan metode kultur, diberi perlakuan ekstrak kloroform daun *Acanthus ilicifolius* dengan berbagai konsentrasi. Sampel dibagi menjadi 7 kelompok, 1: kontrol sel, 2: kontrol media, 3: 40mg/ml, 4: 50mg/ml, 5: 60mg/ml, 6: 70mg/ml, 7: 80mg/ml. Kemudian larutan MTT ditambahkan, 3 menit kemudian dilakukan inkubasi selama 4 jam. Larutan DMSO ditambahkan kemudian dikocok, sampel diperiksa menggunakan *ELISA* reader panjang gelombang 620. Sitotoksitas dinyatakan dengan viabilitas sel, apabila >50%, maka tidak toksik. Data dianalisa menggunakan uji non parametrik (Kruskal-Wallis) dilanjutkan uji Mann-Whitney. **Hasil:** Uji Kruskal-Wallis membuktikan bahwa terdapat perbedaan viabilitas sel yang bermakna antar kelompok perlakuan. Beda rerata antar kelompok diuji dengan Mann-Whitney memperlihatkan perbedaan bermakna pada kelompok 1 dengan 5 dan kelompok 2 dengan 5. **Kesimpulan:** Ekstrak kloroform daun *Acanthus ilicifolius* tidak bersifat toksik terhadap kultur sel fibroblas BHK-21.

**Keywords:** *Acanthus ilicifolius*, irigasi saluran akar, sel fibroblas

**Correspondence:** Twi Agnita Cevanti, Laboratorium Konservasi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hang Tuah, Jl. Arif Rahman Hakim 150, Surabaya, Indonesia. Ph 031-5945864, fax: 031-5912191, e-mail address: [twicevanti2873@gmail.com](mailto:twicevanti2873@gmail.com)

---

## PENDAHULUAN

Perawatan saluran akar merupakan perawatan yang bertujuan mengembalikan keadaan serta mempertahankan agar gigi tetap berfungsi.<sup>1</sup> Pembersihan dan pembentukan saluran akar merupakan tahapan yang penting. Pada tahap tersebut, diperlukan bahan irigasi untuk membersihkan sisa jaringan nekrotik, partikel dentin, mikroorganisme dan sebagai irigasi untuk menghaluskan preparasi saluran akar. Jika prosedur tersebut tidak dilakukan, maka akan menyebabkan sisa debris sebanyak 70% pada dinding dan ujung saluran akar.<sup>2</sup> Syarat bahan irigasi antara lain mampu melarutkan debris atau sisa jaringan, memiliki tegangan permukaan rendah, membantu pelumasan, mampu membuang *smear layer* dan tidak bersifat toksik.<sup>3</sup>

Bahan irigasi yang paling populer adalah Sodium Hipoklorit (NaOCl) yang merupakan agen antimikroba yang baik. Larutan ini tidak mahal, mudah diperoleh dan mudah digunakan.<sup>3</sup> Konsentrasi yang umum digunakan berkisar antara 0,5% hingga 5,25%.<sup>6</sup> NaOCl memiliki kemampuan melarutkan sisa-sisa jaringan nekrotik, komponen organik dentin dan *smear layer*.<sup>4</sup>

NaOCl memiliki kelemahan utama yaitu menurut penelitian O'Hoy *et al*<sup>5</sup>, NaOCl 1% dapat menyebabkan korosi alat endodontik dari baja karbon apabila direndam dalam semalam. Menurut Marion *et al*<sup>6</sup>, pada konsentrasi 1%; 2,5% dan 4,8% dapat menyebabkan toksisitas pada jaringan vital dengan intensitas tergantung dari konsentrasi serta memiliki bau tidak enak.<sup>7</sup> Kebocoran larutan ini selama prosedur perawatan saluran akar dapat menyebabkan gejala seperti nyeri, bengkak, serta memar dan mati rasa.<sup>3,6</sup>

Melihat kelemahan bahan irigasi NaOCl, maka diperlukan upaya mendapatkan alternatif bahan baku irigasi saluran akar yang memiliki khasiat lebih baik, toksisitas lebih rendah, biokompatibel, harga murah dan mudah didapat.

Salah satu ekosistem potensial pada daerah pesisir adalah tanaman mangrove yang memiliki keunikan biokimiawi sehingga mampu menghasilkan berbagai produk alami yang baru.<sup>8</sup> Ekstrak *Acanthus ilicifolius* telah digunakan sebagai obat tradisional untuk mengobati rematik, neuralgia, batuk, asma dan infeksi bakteri.<sup>9</sup>

Hasil fitokimia ekstrak daun mangrove daruju (*Acanthus ilicifolius*) menunjukkan kandungan saponin, alkaloid, terpenoid dan tannin yang berpotensi sebagai antimikroba.<sup>10</sup>

Ekstrak daun *Acanthus ilicifolius* menggunakan konsentrasi 40 mg/ml, 50 mg/ml, 60 mg/ml, 70 mg/ml dan 80 mg/ml berdasarkan penelitian sebelumnya.<sup>11</sup>

## BAHAN DAN METODE

Penelitian yang dilakukan merupakan jenis penelitian *true experimental laboratoris* dengan rancangan penelitian *post test only control group design*. Penelitian dilakukan di PUSVETMA (Pusat Veteriner Farma) Surabaya.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah bejana tertutup, kertas saring, botol *roux*, vortex, mikroskop cahaya, *multichannel* pipet 25µl, corong *Buchner*, labu ukur, gelas ukur, erlenmeyer, tabung reaksi, *microwell plate* 96 lubang, inkubator CO<sub>2</sub>, mikropipet, pipet tetes, pipet volume, sentrifugator, *shaker*, timbangan, autoklaf, *laminar flow*, *ELISA reader*, *water bath*, *mechanical blender*, *hemocytometer*. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Ekstrak daun mangrove Daruju (*Acanthus ilicifolius*) yang digunakan berupa ekstrak *kloroform* daun dengan konsentrasi 40 mg/ml, 50 mg/ml, 60 mg/ml, 70 mg/ml, 80 mg/ml, kultur sel fibroblas BHK-21 (*Baby Hamster Kidney*), media kultur alpha MEM, *trypsine versene*, *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10%, *Phosphat Buffer Solution* (PBS), DMSO (*dimethyl sulfoxide*), kloroform, etil asetat, aquades steril, MTT.

Tahapan pembuatan ekstrak adalah sebagai berikut, daun dikeringkan di tempat teduh tidak terpapar matahari selama 7 hari sampai cukup kering, kemudian dijadikan bubuk dengan menggunakan *mechanical blender*. Sebanyak 500 gram serbuk dimasukkan ke dalam Erlenmeyer dan ditambahkan pelarut kloroform, kemudian di goyang selama 1 jam untuk mendapat kondisi homogen dalam *water bath* dengan kecepatan 120 rpm (*rotary per minutes*). Kemudian larutan dimaserasi selama 24 jam pada suhu kamar. Setelah 24 jam, larutan difiltrasi menggunakan penyaring *Buchner* sehingga menghasilkan residu penyaringan. Kemudian residu penyaringan di angin anginkan dan dilakukan maserasi ulang selama 24 jam. Maserasi diulang hingga 3 kali. Kemudian

seluruh hasil saringan dicampur menjadi satu dan dipisahkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 60°C hingga didapatkan ekstrak inti. Setelah proses pengekstrakan selesai, ekstrak dilarutkan dengan pelarut DMSO 1% hingga didapatkan konsentrasi 40 mg/ml, 50 mg/ml, 60 mg/ml, 70 mg/ml, 80 mg/ml.

Uji sitotoksitas dilakukan dengan metode MTT *assay*. Kultur BHK-21 dalam bentuk monolayer dengan media *eagles* dan Fetal Bovine Serum 10% ditanam dalam botol *roux*, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Sel yang telah penuh dipanen, kemudian dicuci menggunakan *Phospat buffer saline* (PBS) sebanyak 2 kali untuk membuang sisa serum yang tersisa. Kemudian ditambahkan *Versene trypsine* untuk melepaskan sel dari dinding botol dan memisahkan ikatan. Sel fibroblas BHK-21 yang telah didistribusikan dalam sumuran dibagi menjadi kelompok perlakuan yaitu kelompok 1: kontrol sel, kelompok 2: kontrol media, kelompok 3: 40 mg/ml, kelompok 4: 50 mg/ml, kelompok 5: 60 mg/ml, kelompok 6: 70 mg/ml, kelompok 7: 80 mg/ml. Larutan ekstrak dimasukkan ke dalam microplates 96 well sebanyak 100µl. Untuk melakukan pembacaan media dibuang dan dicuci dengan PBS sebanyak 2 kali kemudian ditambahkan dengan media *eagles* dan *fetal bovine serum* 10%. MTT ditambahkan pada *plate* yang berisi medium kultur sebanyak 10 µl, kemudian diinkubasi kembali selama 2-4 jam pada suhu 37°C. Seluruh media dalam sumuran dan bahan uji diambil. Kemudian, setiap sumuran ditambahkan DMSO (*Dimethyl sulfoxide*) sebanyak 50 µl. *Plate* diaduk secara mekanis dengan *Plate Shaker* selama 5 menit sampai kristal formazan terlarut. Sel fibroblas yang hidup akan terwarnai dengan formazan menjadi biru, sedangkan yang mati tidak terbentuk warna biru

Nilai *optical density* formazan dibaca secara spektrofotometri dengan *ELISA reader* pada panjang gelombang 620 nm. Persentase sel hidup dihitung dengan rumus:<sup>22</sup>

$$\% \text{ sel hidup} = \frac{\text{perlakuan} + \text{kontrol media}}{\text{sel} + \text{media}} \times 100\%$$

Keterangan:

% sel hidup : persentase jumlah sel hidup setelah pengujian

Perlakuan : nilai densitas OD (*optical density*) formazan pada setiap sampel setelah pengujian

Media : nilai densitas OD (*optical density*) formazan pada kontrol media

Sel : nilai densitas OD (*optical density*) formazan pada kontrol sel

## HASIL PENELITIAN

Hasil uji sitotoksitas dengan menghitung jumlah sel fibroblas yang hidup dihitung menggunakan uji statistik Kruskal-Wallis dengan taraf signifikansi 95% ( $p=0,05$ ) pada program SPSS versi 20.0.

**Tabel 1.** Rata-rata dan Standar Deviasi Viabilitas Sel Fibroblas

Kelompok Perlakuan	Rata-rata	Standar Deviasi
P <sub>1</sub>	143,843	1,500
P <sub>2</sub>	148,918	9,427
P <sub>3</sub>	145,771	1,984
P <sub>4</sub>	141,286	7,985
P <sub>5</sub>	137,568	1,841

Keterangan :

Kelompok perlakuan P<sub>1</sub> : 40 mg/ml

Kelompok perlakuan P<sub>2</sub> : 50 mg/ml

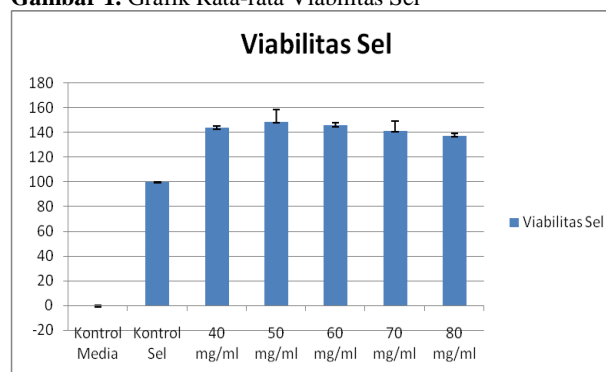
Kelompok perlakuan P<sub>3</sub> : 60 mg/ml

Kelompok perlakuan P<sub>4</sub> : 70 mg/ml

Kelompok perlakuan P<sub>5</sub> : 80 mg/ml

Data hasil penelitian menunjukkan viabilitas sel tertinggi adalah kelompok sel dengan perlakuan P<sub>2</sub>, yaitu kelompok sel dengan pemberian ekstrak daun *Acanthus ilicifolius* 50 mg/ml. Sedangkan viabilitas terendah terjadi pada kelompok perlakuan P<sub>5</sub>, yaitu kelompok sel yang diberi perlakuan ekstrak daun *Acanthus ilicifolius* 80 mg/ml (gambar 1).

**Gambar 1.** Grafik Rata-rata Viabilitas Sel



Berdasarkan tabel hasil uji Mann-Whitney diketahui bahwa perbedaan viabilitas sel yang bermakna terjadi antara kontrol sel

dengan semua kelompok perlakuan, perlakuan 40 mg/ml dengan perlakuan 80 mg/ml ( $p=0,004$ ), dan perlakuan 50 mg/ml dengan perlakuan 80 mg/ml ( $p=0,037$ ).

**Tabel 2.** Hasil Uji Mann-Whitney Antar Kelompok Perlakuan

	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>	P <sub>4</sub>	P <sub>5</sub>
K	0,002*	0,002*	0,002*	0,002*	0,002*
P <sub>1</sub>		0,337	0,092	0,337	0,004*
P <sub>2</sub>			0,337	0,262	0,037*
P <sub>3</sub>				0,337	0,372
P <sub>4</sub>					0,200

## PEMBAHASAN

Konsentrasi yang digunakan pada penelitian ini adalah 40 mg/ml, 50 mg/ml, 60 mg/ml, 70 mg/ml, 80 mg/ml karena, pada penelitian yang dilakukan Rachmawati<sup>11</sup> menunjukkan pada konsentrasi tersebut ekstrak daun mangrove Daruju (*Acanthus ilicifolius*) memiliki efektivitas antibakteri terhadap *Enterococcus faecalis* yang merupakan salah satu bakteri yang umum ditemukan pada saluran akar.

Pada penelitian ekstrak daun mangrove Daruju (*Acanthus ilicifolius*) terhadap kultur sel fibroblas BHK-21 menunjukkan hasil >50% hal tersebut menunjukkan bahwa ekstrak daun mangrove Daruju (*Acanthus ilicifolius*) tidak bersifat toksik bahkan terjadi peningkatan diatas 100%. Perbedaan yang signifikan terjadi antara kelompok perlakuan 40 mg/ml dengan 80 mg/ml ( $p=0,004$ ) dan kelompok perlakuan 50 mg/ml dengan 80 mg/ml ( $p=0,037$ )

Berdasarkan hasil penelitian Gayathri et al<sup>12</sup>, ekstrak daun *Acanthus ilicifolius* mengandung alkaloid, saponin, fenol, flavonoid, tannin, terpenoid, karbohidrat. Beberapa diantara kandungan tersebut bersifat sitotoksik yaitu saponin, tanin, alkaloid dan terpenoid. Peningkatan viabilitas sel fibroblast BHK-21 diduga karena selain terdapat kandungan yang

bersifat toksik, terdapat pula kandungan yang memicu proliferasi sel antara lain flavonoid, karbohidrat, dan fenol.

Flavonoid dalam jumlah kecil dapat memicu efek antiapoptosis melalui supresi *peroxide-induced JNK-c-Jun/AP-1 pathway*. Flavonoid dapat menghambat *MAP* kinase, *cAMP-dependent kinase*, protein kinase C, dan beberapa kinase lain. Terhambatnya *MAP* kinase ini menyebabkan supresi *JNK-c-Jun/AP-1 pathway*.<sup>13</sup> Flavonoid juga bertindak sebagai antioksidan intraseluler yang mengembalikan sistem antioksidan intraseluler untuk melindungi dari kerusakan akibat ROS.<sup>14</sup>

Fenol diketahui sebagai antioksidan yang dapat melawan spesies oksigen aktif yang berbahaya. Fenol bekerja sebagai antioksidan dengan cara mendonasikan elektron kepada guaiacol peroksidase (GuPXs) untuk detoksifikasi. Beberapa literatur menyebutkan bahwa fenol dapat menghambat prooksidasi dan sifat sitotoksik dalam beberapa kondisi.<sup>15</sup>

Ekstrak daun *Acanthus ilicifolius* memiliki kandungan karbohidrat yang merupakan sumber energi yang penting untuk reaksi-reaksi biokimia. Karbohidrat berperan sebagai nutrisi yang dimetabolisme untuk menghasilkan *ATP*. *ATP* akan digunakan untuk proses persiapan sintesis DNA pada fase G<sub>1</sub> menuju ke fase S pada siklus sel. Pada fase G<sub>1</sub> sel memerlukan *ATP* untuk sintesis mRNA, Jika pada fase G<sub>1</sub> nutrisi tidak mencukupi, maka sel akan masuk ke fase S untuk memulai replikasi DNA.<sup>16,17,18</sup>

Penurunan viabilitas yang terjadi pada kelompok perlakuan 60 mg/ml, 70 mg/ml dan 80 mg/ml dapat disebabkan karena pembentukan formazan ungu oleh garam tetrazolium mengacu pada sel yang aktif secara metabolik. Aktivitas metabolik tiap sel berbeda. Terkadang dijumpai sel yang hidup dan menunjukkan aktivitas metabolik tetapi hanya sedikit atau bahkan tidak berproliferasi.<sup>19</sup>

Selain tergantung dari aktivitas metabolik sel terhadap formazan, ketidaksesuaian hasil pembacaan juga dapat disebabkan kandungan dari bahan uji. Bahan uji dapat berkontak secara langsung dengan *MTT*. Contohnya asam askorbat dan polifenol yang dapat mereduksi *MTT* walaupun tidak ada sel yang hidup.<sup>20</sup> Selain itu, bahan uji juga dapat mempengaruhi pembacaan. Bahan uji yang diperoleh pada percobaan ini berbentuk larutan keruh. Hal ini membuat proses pembacaan menggunakan *ELISA reader* terganggu karena

terjadinya penghamburan cahaya sehingga diduga akan terjadi *false negatif*.<sup>21</sup>

## KESIMPULAN

Pada penelitian ini secara umum dapat disimpulkan bahwa ekstrak daun mangrove Daruju (*Acanthus ilicifolius*) tidak bersifat toksik terhadap kultur sel fibroblas BHK-21.

## DAFTAR PUSTAKA

- Soedjono P, Mooduto L, Setyowati L. 2009. Penutupan Apeks Pada Pengisian Saluran Akar Dengan Bahan Kalsium Oksida Lebih Baik Dibanding Kalsium Hidroksida. Jurnal Persatuan Dokter Gigi Indonesia, 58(2):1-5
- Rochyani L, Aprilia. 2010. Sitotoksitas Ekstrak Biji Jinten Hitam (*Nigella Sativa*) Sebagai Bahan Irigasi Saluran Akar, p 1
- Torabinejad M, Walton RE. 2008. Prinsip & Praktik Ilmu Endodonsia. Ed.3. Jakarta : Penerbit buku kedokteran EGC, pp 243-44
- Schäfer E. 2007. Irrigation of the root canal. Endo, 1(1): 15
- O'Hoy PY, Messer HH, Palamara JE. 2003. The effect of cleaning procedures on fracture properties and corrosion of NiTi files. Int Endod J, 36(11): 724-732.
- Marion JJC, Manhaes FC, Bajo H, Duque TM. 2012. Efficiency of different concentrations of sodium hypochlorite during endodontic treatment. Literature review. Dental Press Endod, 2(4): 32-37
- Spencer HR, Ike V, Brennan PA. 2007. Review: The Use of Sodium Hypochlorite in Endodontics – Potential Complications
- Rondonuwu A, Wantasen A, Ontorael R. 2012. Kondisi Ekologi dan Pemanfaatan Sumber Daya Mangrove di Desa Tarohan Selatan Kecamatan Beo Selatan Kabupaten Kepulauan Talaud. Jurnal Ilmiah Platax 1(1): 3
- Khajure V, Rathod JL. 2010. Antimicrobial activity of extracts of *Acanthus ilicifolius* extracted from the mangroves of Karwar coast Karnataka. Recent Res Sci Technol, (2): 98-9
- Govindasamy C, Arulpriya M. 2013. Antimicrobial activity in *Acanthus ilicifolius* extracted from the mangroves of Karwar coast Karnataka. Recent Rest Sci Technol, (2): 98-9
- Rachmawati H. 2015. Efektivitas Antibakteri Ekstrak Daun Mangrove *Acanthus ilicifolius* Terhadap Biofilm *Enterococcus faecalis*. Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hang Tuah. Skripsi. Surabaya, p 26
- Gayathri GA, Mahalingam G, Nathiya R. 2015. Quantitative Phytochemical Analysis, In vitro Reducing Power and anti-oxidant Activity of Methanol Leaf Extract of *Acanthus ilicifolius*. International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research, 7(1):181-6
- Ishikawa Y, Kitamura M. 2000. Anti-apoptotic effect of quercetin: intervention in the JNK- and ERK-mediated apoptotic pathways. Kidney International, 2000(58):1078-1087
- Tang X, Zhang Cm Zeng Wm Mi Y, Liu H. 2006. Proliferating effects of the flavonoids daidzain and quercetin on cultured chicken primordial germ cells through antioxidant action. Cell Biology International, 30(2006): 445-51
- Sahikama Y, Cohen FM, Grace SC, Yamasaki H. 2002. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals plants. Toxicology, 177:67-80
- Foster YA, Yellen P, Xu L, Saqcena M. 2010. Regulation of G<sub>1</sub> Cell Cycle Progression. Genes Cancer, 1(11): 1124-31
- Sholl-Franco A, Fragel-Madeira L, Macama Ada C, Linden R, Ventura AL. 2009. ATP controls cell cycle and induces proliferation in the mouse developing retina. Int J Dev Neurosci, 28(1): 63-73
- Mc Kee T, Mc Kee J. 2011. Biochemistry: The Molecular Basis of Life, 5<sup>th</sup> Ed. Inggris: Oxford University Press, pp. 47-58
- Buch K, Peters T, Noworth T, Sanger M, Schmidberger H, Langguth P. 2012. Determination of Cell Survival After Irradiation Via Clonogenic Assay versus Multiple MTT Assay-a Comparative Study. Radiation Oncology, 2012(7):1
- Jaszczyszyn A & Gasiorowski K. 2008. Limitations of the MTT Assay in Cell Viability Testing. Adv Clin Exp Med 17(5):525-29
- Siregar SN. 2011. Sitotoksitas Ekstrak Lerak (*Sapindus rarak DC*) Terhadap Sel Fibroblas Sebagai Bahan Irigasi Saluran Akar Secara *In Vitro*. Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Sumatera Utara. Skripsi. Medan, p.19